

AISLAMIENTO DE *Saprolegnia* sp. (Fungi: Saprolegniaceae) DE *Oncorhynchus mykiss* (PISCES: SALMONIDAE) "trucha arco iris" EN CAUTIVERIO.

***Saprolegnia* sp. (Fungi: Saprolegniaceae) ISOLATION FROM *Oncorhynchus mykiss* (PISCES: SALMONIDAE) "rainbow trout" CULTURE**

Libertad Alzamora y Julia Castro*

RESUMEN

El objetivo del estudio fue demostrar el origen infeccioso de la mortandad de alevinos y de las lesiones presentadas en adultos de *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792, "trucha arco iris", en la piscigranja "El Ingenio", empleando una metodología simple y efectiva.

Se colectaron alevinos, ovas, adultos y muestras de agua de las pozas de alevinos. Las muestras se cultivaron sobre semillas de *Cucurbita maxima* "zapallo", como sustrato, evidenciándose colonias típicas a los siete días. Las características microscópicas de las hifas correspondieron al patrón gráfico de *Saprolegnia* sp., lo que concuerda con la sintomatología observada en los adultos capturados. La presencia de este patógeno estaría relacionada con la elevada mortandad registrada en los alevinos (40%), probablemente por la importación de las ovas infectadas con el hongo. El método fue efectivo, porque el sustrato empleado, favoreció el crecimiento del hongo, y es de fácil aplicación y bajo costo.

Palabras clave: *Saprolegnia* sp., acuicultura, *Oncorhynchus mykiss*, alevinos, *Cucurbita maxima*.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the infectious origin of the alevines mortality and lesions observed in adults of *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792, "rainbow trout", in the fishfarm "El Ingenio" using a simple and effective methodology.

Alevines, eggs and adult forms and samples of water from ponds were collected. These samples were cultivated on seeds of *Cucurbita maxima* "calabash" as substrate, where typical colonies had been developing after seven days. Microscopic characteristics of the hyphae, fitted the graphic pattern of *Saprolegnia* sp. (fungi), which is related to the symptomatology observed in the captured adults. The presence of *Saprolegnia* sp. would be related to high mortality of alevines registered (40%), probably for importation of eggs contaminated with the fungi. The method was efficient because the substrate has permitted the development of the fungi for an easy and cheaply application.

Key words: *Saprolegnia* sp., *Oncorhynchus mykiss*, aquaculture, alevines, *Cucurbita maxima*.

INTRODUCCIÓN

En zonas de la región alto-andina del Perú se ha incrementado el desarrollo de la acuicultura a través de la creación de nume-

rosas piscigranjas, especializadas en el cultivo de *Oncorhynchus mykiss* (Pisces: Salmonidae) "trucha arco iris", que además, en su forma fresca, salada o ahumada, forma parte de la dieta alimenticia del poblador.

Las infecciones micóticas son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad en peces de agua dulce, sobre todo en piscigranjas, lo que hace que tengan una es-

* Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Epidemiología. ICBAR Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM Lima-Perú.
d190002@unmsm.edu.pe

pecial importancia económica al incidir directamente en el rendimiento de la explotación comercial (Fernández *et al.*, 1990).

Las infecciones por *Saprolegnia* pueden ocurrir en cualquiera de los estadios del ciclo de vida de los peces (López-Dóriga y Martínez, 1998). Independientemente de que *Saprolegnia* actúe como patógeno primario o secundario, la sintomatología corresponde a la presencia de manchas infecciosas que crecen y destruyen gradualmente tejidos tegumentarios. Las hifas rara vez penetran hasta órganos internos; usualmente se limitan a la epidermis, dermis y músculo superficial. Sin embargo, en infecciones severas, las hifas también pueden invadir órganos internos como el estómago (Martínez, *et al.*, 1987; Willoughby, 1994).

El proceso infeccioso es severo en alevinos en los que el hongo logra un desarrollo que interrumpe funciones vitales y ocasiona la muerte. La infección se facilita en ausencia de mucus, ya que los peces carecen de queratina en la epidermis (Muñoz *et al.*, 1987; Scott y O'Bier, 1962).

Las condiciones de vida en cautiverio, especialmente alta densidad y lesiones, propician la infección de los especímenes, y la calidad del agua resulta ser un factor que facilita la prevalencia del patógeno en el medio (Muller y Loeffler, 1976).

Existen 17 géneros de la Familia Saprolegniaceae, pero en el Perú no hay reportes de estudios taxonómicos ni morfológicos de esta familia. *Saprolegnia* sp. se ha aislado en una variedad de medios de cultivo, y su identificación se ha realizado a través de la caracterización de las hifas no septadas que forman la colonia o están en las lesiones, datos que se emplean con propósitos de diagnóstico (Bruno y Poppe, 1996) e identificación clínica (Noga, 1996).

Noguchi (1976) logró aislar el género *Saprolegnia* empleando semillas de "zapallo" (*Cucurbita maxima*) con buenos resultados.

El presente trabajo permitió demostrar que el agente causal de la mortandad de alevinos y de las lesiones presentadas por los adultos es el hongo *Saprolegnia* sp., para lo cual se empleó una metodología simple que permite el diagnóstico efectivo de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de ovas, alevinos y tегu-mento de adultos

Las muestras se colectaron de la piscigranja "El Ingenio", ubicada en el Valle de Concepción de la ciudad de Huancayo (departamento de Junín), a 2800 msnm.

Se calculó el porcentaje de mortandad de alevinos de las diferentes pozas de incubación y se seleccionaron aleatoriamente 10 pozas de incubación, tomándose al azar 2 alevinos con signos de infección por cada poza, haciendo un total de 20 muestras. También se seleccionaron ovas fértiles e infértiles y se realizó el raspado de los bordes de la piel afectada (Figura 1) para su cultivo y observación microscópica con azul de lactofenol.

El material fue macerado en solución salina estéril (SSE). Paralelamente, se recolectaron 10 mL de agua de cada poza y se procedió a centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, el sedimento se resuspendió en 2 mL de SSE.

2. Preparación del sustrato

Para preparar el medio de cultivo, se modificó la metodología descrita por Noguchi (1976). Se usó como sustrato semillas de "zapallo" de consistencia y de superficie intactas. Las semillas fueron hervidas en agua destilada estéril (ADE) durante 3 minutos, luego se decantó el agua y se fraccionaron las

semillas en 2 y 4 partes, hirviéndolas nuevamente durante 3 minutos.

Las semillas preparadas se extrajeron con pinzas y se colocaron en placas petriestériles.

3. Siembra de las muestras

Se sembraron 2 mL del macerado de alevinos y ovas, y el raspado de piel de los adultos afectados, a los cuales se agregó 5 µg/mL de cloranfenicol como inhibidor de bacterias. Este volumen se distribuyó sobre las semillas preparadas de "zapallo". De igual manera, se tomaron 2 mL de sedimento resuspendido de cada muestra de agua, con 5 µg/ml de cloranfenicol, distribuyéndolos por duplicado.

Se utilizó como control el sustrato inoculado con SSE. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (20 °C), realizándose observaciones diarias.

4. Métodos de control

Después de la colección de muestras; las pozas de alevinos fueron desinfectadas con derivados clorados, se retiraron los alevinos con signos de enfermedad y las ovas sospechosas de estar infectadas, se eliminaron. Es importante señalar que esta fue la segunda vez que se presentó este brote al emplear ovas importadas del mismo lugar (Canadá). Las pozas de los adultos también fueron lavadas y desinfectadas, los especímenes adultos con signos de infección fueron capturados y sacrificados. Considerando que por esta época también se presentaron otras patologías de probable origen infeccioso, se hacía urgente proceder a la desinfección meticulosa de las pozas de la Piscigranja.

RESULTADOS

1. Ovas. No se aisló *Saprolegnia* de ninguna de las muestras procesadas.

2. Alevinos. En las 10 pozas evaluadas, se determinó un promedio de 40% de mortandad. A los 7 días, en el 50% de muestras de

alevinos sembradas (10 muestras), se observaron colonias blancas y algodonosas que desarrollaron sobre las semillas de zapallo. Al microscopio estereoscópico, el micelio presentaba una base más ancha que la apical; alrededor de los 10 días, a medida que la zona apical iba madurando adoptó tono oscuro, y se tornó de color marrón. La morfología micelial se detalló por microscopía óptica, sin observarse zoosporas ni oosporas (Figura 2).

La identificación de género se hizo en base a las estructuras reproductoras asexuales. Las hifas de los cultivos se compararon con los patrones miceliales gráficos de los hongos característicos de los ambientes acuáticos, como son los géneros *Achyla*, *Leptonictus*, *Aphanomyces* y *Dictyuchus* y se evidenció su identidad con *Saprolegnia* sp. (identificación confirmada por el Dr. Juan Mattos, del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM).

3. Adultos. En el raspado de piel se observaron hifas aseptadas, que no desarrollaron sobre las semillas de "zapallo"; la morfología de estas hifas no mostró definición tan marcada como las logradas en los cultivos; sin embargo, la relación entre su presencia y los signos típicos de infección son suficientes para designar a *Saprolegnia* sp. como el microorganismo causante de las lesiones (Figura 1 y Figura 2), y se puede emplear como criterio de diagnóstico (Bruno y Poppe, 1996; Noga, 1996).

4. Agua. Se aisló *Saprolegnia* sp. de las muestras de agua de 5 pozas. En ningún caso se aislaron del agua y de los alevinos de una misma poza.

5. Aplicación de métodos de control. La mortandad disminuyó notablemente cuando se procedió a la limpieza y desinfección de las pozas con derivados clorados. Mediante la eliminación de las ovas se logró controlar definitivamente la epidemia registrada.

DISCUSIÓN

El desarrollo de lesiones epidermales ocasionadas por *Saprolegnia* en “truchas” ha sido categorizada en cuatro grados de acuerdo a su severidad (López-Dóriga, 1995). Las infecciones más severas corresponden al cuarto grado y se caracterizan por la presencia de numerosas hifas, una epidermis residual y pérdida de continuidad de la membrana basal. Los resultados obtenidos sugieren que los especímenes adultos evaluados sufrieron infección por *Saprolegnia* en los niveles 3 y 4, como se aprecia en la Figura 1; el tegumento despigmentado y la presencia de hifas en la lesión son datos que coinciden con los considerados por autores como López-Dóriga y Martínez (1998).

Por otro lado, cualquiera de los estadios de desarrollo de las “truchas” es susceptible a la infección con *Saprolegnia* (Bruno y Poppe, 1996), hecho que se ha logrado confirmar en la presente investigación. La mortandad de alevinos cesó cuando se eliminaron las ovas, lo que indica que pese a no haberse aislado *Saprolegnia* a partir de estas muestras, la contaminación se iniciaba a este nivel. El tratamiento de las pozas con desinfectantes comerciales empleados rutinariamente como derivados clorados también fue útil para disminuir la mortandad de alevinos, lo que indica el origen infeccioso de la patología.

La elevada mortalidad (40%) que se presentó en los alevinos permite relacionar la presencia del género *Saprolegnia* con este evento, lo cual fue confirmado por su aislamiento a partir de los alevinos y del agua de las pozas de incubación. Las pozas de alevinos se ubicaban en la parte alta de la piscigranja, las pozas de los adultos y juveniles se ubicaban en la parte baja de la piscigranja, y el agua que las alimentaba se mezclaba con el agua de las pozas de alevinos, lo que sugiere contaminación previa.

No se puede descartar la presencia de otros hongos acuáticos que también están asociados a esta patología. Scott y O'Bier (1962) determinaron que además de *Saprolegnia*, otras especies como *Achyla bisexualis* y *Aphanomyces* sp. incrementan el daño tegumentario. Uno de ellos puede ser determinante sólo si su efecto patológico es ampliado por la participación de los demás hongos. Además, determinaron la influencia de la temperatura del agua que favorece la presencia de estos hongos. Este dato coincide con la época en la que se registró este brote (julio), que fue la más fría del año (12 °C) en la zona de la piscigranja. La enfermedad está asociada con la inmunosupresión ocasionada por la disminución de temperatura, niveles elevados de amonio (eliminado en la orina) o *stress* (Hughes, 1962; Roberts, 1978; Roberts y Shepherd, 1974). Estos factores han estado presentes ya que, además de *Saprolegnia*, se determinaron otras patologías de origen infeccioso, compatibles con septicemia hemorrágica viral.

Huet (1973) señala que estos hongos parásitos son el resultado de problemas nutricionales; el efecto es mortal si los peces están mal alimentados.

El reconocimiento y clasificación de los hongos responsables de las infecciones en peces ha sido objeto de discusión desde que aparecieron las primeras publicaciones sobre este tema. En muchos estudios sobre infecciones micóticas, no queda suficientemente claro qué especies están involucradas. Esto se debe, en parte, al hecho de que muchos aislados de *Saprolegnia* no desarrollan fácilmente estructuras sexuales en cultivo, y por consiguiente, no pueden ser identificados a nivel de especie. La mayoría de los géneros de la familia Saprolegniaceae se identifican por las características de las hifas (criterio empleado en el presente estudio), el modo de producción de esporangios y la forma de liberación de las zoosporas, mientras que la determina-

ción de especies de *Saprolegnia* se basa en la morfología de los oogonios, anteridios y oosporas (Seymour, 1970, López-Dóriga, 1995).

Las lesiones de los adultos y la presencia de hifas observadas en estas se tomaron como elemento de clasificación de acuerdo a las recomendaciones de Noga (1996), Baschwitz et al. (1987), Martínez et al. (1987) y Seymour (1970). La definición de género se hizo en base a las estructuras reproductoras asexuales, lo cual es totalmente válido (Noga, 1996).

La metodología de Noguchi (1976) para la preparación del sustrato fue modificada en el presente estudio, ya que Noguchi hirvió las semillas una sola vez durante 10 minutos; al repetir este paso, se obtuvo un ablandamiento exagerado de las semillas, con desprendimiento de una sustancia mucoide que no permitió la visualización de las colonias.

Se comprobó que este sustrato reemplaza con mucha eficiencia a las semillas de *Cannabis sativa* empleadas convencionalmente (Noguchi, 1976).

El aislamiento de *Saprolegnia* sp. a partir de peces mantenidos en cautiverio coincide con los estudios realizados en el país por Ruíz (1974) y Noguchi (1976); sin embargo, es necesario realizar estudios acerca de la persistencia de otros hongos acuáticos en los criaderos de peces, principalmente en las truchifactorías, de manera que se puedan tomar medidas preventivas y evitar cuantiosas pérdidas económicas.

CONCLUSIONES

1. La presencia de *Saprolegnia* sp. está relacionada con las lesiones de los adultos y con la mortandad de los alevinos, ya que en las pozas en las que la mortandad fue mínima, no se aisló del agua o de los alevinos.

2. La metodología para el aislamiento de *Saprolegnia* sp. empleando semillas de *Cucurbita maxima* "zapallo" es útil para el aislamiento primario, pero debe complementarse con otras que permitan el desarrollo de las estructuras reproductoras y la determinación de especie.

LITERATURA CITADA

- Baschwitz, G. G.; C. Fernández-B. de Quiros; J. L. Martínez y C. Muñoz. 1987. "Alteración de la estructura superficial de la epidermis en truchas (*Salmo trutta* L.) infectadas por *Saprolegnia*". Rev. Biol. Univ. Oviedo. 5: 29-37.
- Bruno, D. y T. Poppe. 1996. A Colour Atlas of Salmonid Diseases. London, Academic Press. Limited. 194 pp.
- Fernández-B. de Quiros, C.; G. G. Baschwitz y J. L. Martínez. 1990. Actas III Congreso Nac. Acuicult. 727- 732.
- Huet, M. 1973. Tratado de Piscicultura. Madrid, Mundiprensa. 350 pp.
- Hughes, G. C. 1962. "Seasonal periodicity of the Saprolegniaceae in the South eastern United States". Trans. Brit. Mycol. Soc. 45:519-531.
- López-Dóriga, M. V. 1995. Patología ultraestructural del tegumento de truchas (*Salmo trutta* L.) infectadas por *Saprolegnia*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas.
- López-Dóriga, M. V. y J. L. Martínez. 1998. "Ultrastructure of fish cells involved in cellular defences against *Saprolegnia* infections: evidence of non-leucocytic nature". Dis. Aquat. Org. 32: 111-117.
- Martínez, J. L.; C. Fernández-B. de Quiros; G. G. Baschwitz y C. Muñoz. 1987. "Evolución de las lesiones causadas por *Saprolegnia* en el tegumento de trucha (*Salmo trutta* L.)". Cuad. Marisq. Publ. Téc. 12: 615-620.
- Muller, E. y W. Loeffler 1976. Micología. Edit. Omega, S.A. Barcelona. 250 pp.
- Muñoz, C.; J. L. Martínez; C. Fernández-B. de Quiros y G. G. Baschwitz. 1987. "Células granulofilamentosas en la epidermis de truchas (*Salmo trutta* L.) infectadas por *Saprolegnia*". Rev. Biol. Univ. Oviedo. 5: 19-27.
- Noga, E. 1996. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. St. Louis, Missouri. Mosby-Year Book, Inc. 367 pp.
- Noguchi, J. 1976. Algunos hongos saprolegniáceos presentes en estanques de crianza de Peces. Tesis

- para optar Título de Biólogo. Univ. Nac. Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Roberts, R. J. y C. J. Shepherd. 1974. Enfermedades de la trucha y el salmón. Zaragoza, Acribia. 187 pp.
- Roberts, R. J. 1978. "The mycology of teleosts". In: Fish Pathology. Baillieri Tindall. London, Pp: 205-215.
- Scott, W. y M. O'Bier. 1962. "Aquatic fungi associated with disease fish and fish eggs". The program fish cult. 24:3-15.
- Seymour, R.L. 1970. The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19: 1-124.
- Willoughby, L.G. 1994. Fungi and fish diseases. Stirlin, Pisces Press, 380 pp.

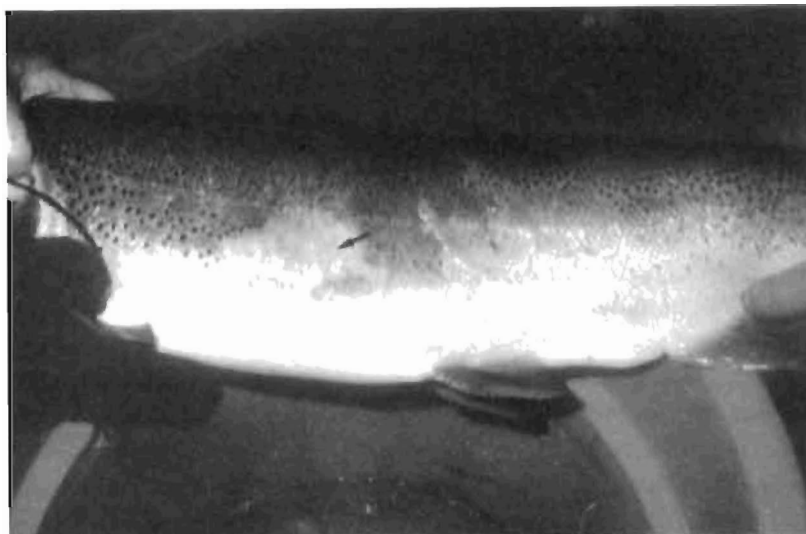


FIGURA 1. *Oncorhynchus mykiss* (Pisces: Salmonidae) "trucha arco iris". La flecha señala la lesión producida por *Saprolegnia* sp. (Fungi: Saprolegniaceae).

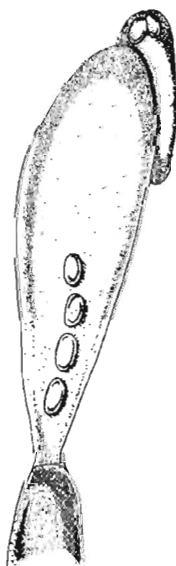


FIGURA 2. Ápice hifal característico de *Saprolegnia* sp. (Fungi: Saprolegniaceae) de colonias desarrolladas sobre semillas de *Cucurbita maxima* "Zapallo".